昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，November 2007，50(11)：1092－1098 ISSN 0454-6296

家蚕生殖细胞相关基因 *nanos* 的克隆表达及在胚胎发育中的表达模式

赵国力，陈克平*，姚　勤，郭忠建

（江苏大学生命科学研究院，江苏镇江　212013）

摘要：【目的】探讨 *nanos* 基因在家蚕 *Bombyx mori* 胚胎发育中的表达模式，为进一步研究该基因在家蚕胚胎发育中的功能奠定基础。【方法】根据本实验室提交到 GenBank 中家蚕 *nanos* 的 cDNA 序列（登录号 EF647589）设计引物，扩增出了一条长 684 bp 的编码片段，对该片段进行了克隆和表达，亲和纯化表达的蛋白并免疫新西兰大白兔制备抗体。Western blot 检测家蚕早期胚胎 nanos 的表达情况，荧光定量 PCR 检测 *nanos* 在整个家蚕胚胎发育中的表达情况。【结果】克隆并表达了一条长 684 bp 的编码片段，得到了分子量约 33 kD 的融合蛋白。用制备的抗血清对家蚕早期胚胎蛋白的 Western blot 检测表明，nanos 在此阶段基本是恒定表达。荧光定量 PCR 结果显示刚产的卵中 *nanos* 的表达量最大，第 2 天开始急剧下降，此后到第 10 天表达量几乎没有变化。【结论】本实验克隆的 *nanos* 是家蚕中的一个同源物，该基因在家蚕胚胎发育中的表达模式与蜜蜂等有很大的不同，反映了昆虫生殖细胞形成机制的多样性。

关键词：家蚕；*nanos*；胚胎发育；原始生殖细胞；荧光定量 PCR；Western blot

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)11-1092-07

Cloning and expression of *nanos*，a gene related to germ stem cell and its expression pattern in embryo development in silkworm

ZHAO Guo-Li，CHEN Ke-Ping*，YAO Qin，GUO Zhong-Jian (Institute of Life Sciences，Jiangsu University，Zhenjiang，Jiangsu 212013，China)

Abstract：【Objective】To explore the expression pattern of *nanos* in *Bombyx mori* embryo and make preparations for the further study on this gene's function in silkworm embryo development.【Methods】The primers were designed according to the cDNA sequence (GenBank accession no：EF647589) of *B*. *mori nanos* gene submitted to GenBank database by our laboratory，and used to amplify a fragment of 684 bp. Subsequently，the fragment was cloned and expressed in *E*. *coli* (BL21). The fusion protein was purified by using the affinity chromatography and the purified protein was then used to immunize the New Zealand white rabbit to get the antiserum. The Western blot method was used to explore the expression pattern of *nanos* in early embryo of *B*. *mori*. The expression pattern of *nanos* through the whole developmental stage of *B*. *mori* embryo was studied by real-time PCR.【Results】One fragment encoding *nanos* with 684 bp in length was cloned and expressed，and the fusion protein with the molecular weight about 33 kD was obtained. The Western blot using the antiserum prepared was performed on the proteins from *B*. *mori* early embryo，and showed that nanos protein was expressed almost constantly. The real-time PCR analysis on *B*. *mori* embryos at different developmental stages showed that the expression level of *nanos* peaked in newly laid eggs and started to drop dramatically from the second day，since which almost no change was detected till the tenth day after eggs were laid.【Conclusions】The gene cloned in this study was a *nanos* homolog in *B*. *mori*. The fact that its expression pattern in embryo development differs greatly from that of its counterpart in honeybee reflects the diversity of mechanisms for the formation of germ cells in insects.

基金项目：国家重点基础研究发展规划‘973’计划项目（2005CB121000）

作者简介：赵国力，男，1982 年 9 月生，河南人，硕士研究生，从事生物化学与分子生物学研究，E-mail：guo0601@yahoo.com.cn

* **通讯作者** Author for correspondence，Tel.：86-511-8791923；Fax：86-511-8791923；E-mail：kpchen@ujs.edu.cn

收稿日期 Received：2007-06-11；**接受日期** Accepted：2007-07-30

Key words：*Bombyx mori*；*nanos*；embryo development；primordial germ cells；fluorescence quantitative PCR；Western blot

在发育生物学中，个体形态的形成以及性腺的形成是两个非常重要的过程。有很多基因在这些过程中起着关键的作用，它们相互作用调控着整个发育过程，其中 *vasa* 和 *nanos* 就是非常重要的两个基因。*vasa* 是广泛用于生殖细胞标记的基因，最早发现于果蝇中，其编码一个 DEAE（Asp-Glu-Ala-Asp）框的 RNA 解旋酶。*vasa* 相关因子在生殖细胞中起作用（Olsen *et al*.，1997），在许多动物的原始生殖细胞（primordial germ cells，PGCs）都有表达（Dearden，2006），但是在不同的物种中以何种方式起作用仍然不清楚。

nanos 是最先在果蝇的生殖颗粒中被鉴定的一个母源效应组分，其编码一种锌指结构蛋白，蛋白的 C 端含有两个典型的由 CCHC 组成的锌指结构，此蛋白可以特异性地结合 RNA，在昆虫胚胎后部区域的特殊分化中起重要作用（Wang and Lehmann，1991；Calvo *et al*.，2005）。nanos 蛋白在早期胚胎中有两个功能：第一，nanos 蛋白与 RNA 结合蛋白 pumilio 一起抑制母源 mRNA *hunchback* 的翻译，这一功能在胚胎后腹部细胞的特异性分化过程中起着至关重要的作用（Hulskamp *et al*.，1989；Irish *et al*.，1989）；第二，nanos 蛋白对原始生殖细胞的发育是必不可少的，母源 nanos 蛋白的缺失导致原始生殖细胞不能正常移动到性腺，从而产生无功能的生殖细胞（Kobayashi *et al*.，1996；Forbes and Lehmann，1998）。

在果蝇中已经详细地研究了 *nanos* 的调节作用。在卵母细胞和胚胎中，*nanos* 只在生殖质中翻译，并且其蛋白最后整合到极细胞中，即果蝇原始生殖细胞的前体（Wang *et al*.，1994）。*nanos* 缺陷型的果蝇的原始生殖细胞不能形成性腺，生殖细胞过早成熟，有异常的形态（Forbes and Lehmann，1998；Deshpande *et al*.，1999）。与果蝇相似，缺乏 *nanos* 功能的线虫，其原始生殖细胞大部分会死去（Kraemer *et al*.，1999）。老鼠有 3 个类 *nanos* 基因，其中有 2 个在原始生殖细胞中表达，对原始生殖细胞生活力的维持是必须的（Dearden，2006）。

nanos 相关基因在水蛭 *Helobdella robusta*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、蝗虫 *Schistocerca gregaria* 以及人 *Homo sapiens* 等物种中也有发现，其功能也都与生殖细胞或个体发育的成型相关（Kraemer *et al*.，1999；Jaruzelaks *et al*.，2003；Calvo *et al*.，2005；Agee *et al*.，2006；D'Agostino *et al*.，2006）。

本研究首次对家蚕 *nanos* 相关基因（*Bm-nanos*）片段进行了克隆表达，用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测了该基因在家蚕胚胎发育中的表达模式。

1　材料和方法

1.1　菌种和载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* TG1 和 BL21（star），由江苏大学生命科学研究院保存；克隆载体 pMD18-T 为 TaKaRa 宝生物工程（大连）有限公司产品；表达载体 pET-30a 购自 Novagen 公司。

1.2　主要试剂

DNA 限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ，T4 DNA 连接酶，Taq DNA 聚合酶，荧光定量 PCR 试剂 SYBR® ExScript™ RT-PCR Kit（Perfect Real Time），SDS-PAGE 相关产品购自 TaKaRa 宝生物工程（大连）有限公司。RNA 抽提试剂 RNeasy mini kit 和反转录的所有试剂均购自 QiaGen 公司。HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自天根公司。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3　家蚕 nanos 的保守性分析

对我们提交到 GenBank 中的家蚕 *nanos* 编码的蛋白序列，在 NCBI 中寻找其保守结构域。分别取 Swiss-Prot 数据库中埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（Q6PRX0），黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（P25724），意大利蜜蜂 *Apis mellifera*（Q2PZC1），冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（Q6PRW8）的 nanos 蛋白序列，用 GENEDOC 软件进行多序列比对，同时用 MEGA3.1 构建系统发育树。

1.4　家蚕卵巢、精巢及卵总 RNA 提取及 cDNA 的合成

取 5 龄第 5 天的家蚕精巢和卵巢组织，在 DEPC 水配制的生理盐水中去除其他的组织，液氮中冷冻，最后移到 -70℃冰箱中保存；取上述保存的组织各 30 mg，按 RNeasy mini kit 操作手册进行 RNA 的提取，用 gene spec Ⅲ 测定浓度。按反转录试剂说明进行 cDNA 的合成，总反应体积为 25 μL，RNA 模板量为 2 μg。反应体系：引物、模板和无 RNase 水混合，

在 70℃变性 5 min，取出后立即放冰上 2 min，再加逆转录酶和其他试剂。PCR 反应条件：37℃反应 1 h，75℃反应 5 min，最后保持在 4℃。取家蚕不同发育时期的卵[产卵后 0 天（新产卵）、1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天和 10 天]100 粒迅速在液氮中冷冻，一式 3 份，置于 -70℃冰箱中保存，按上述同样的方法提取总 RNA 及 cDNA 的合成。

1.5 *Bm-nanos* 片段的 PCR 扩增及克隆表达

根据本实验室提交到 NCBI 数据库的 *nanos* 序列（GenBank 序列号 EF647589），从一个长 684 bp 的片段（是一个编码框）两端设计引物，分别在两引物的 5′端引入 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 的酶切位点，引物序列如下：正向引物 5′-atgaattcatgcgactcaatggcactg-3′，反向引物 5′-ccctcgagttagttcatgctgaaacttgtc-3′。

以精巢的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，回收 PCR 片段克隆到 pMD18-T 载体中，*Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切鉴定后，得到质粒 pMD18-T-Bm-nanos，并对其进行测序。尔后用 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 分别双酶切 pMD18-T-Bm-nanos 和 pET30a，回收目的片段并连接，连接产物转化克隆菌 *E. coli* TG1，抽提质粒，*Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 分别双酶切鉴定后得到表达质粒 pET30a-Bm-nanos。将表达质粒转化 *E. coli* BL21 (star)，加入 IPTG 诱导培养过夜，收集菌液，进行 SDS-PAGE 检测，以空质粒的 BL21 菌液和转化 pET-30a 质粒的 BL21 菌液作对照。

大量诱导表达并纯化回收融合蛋白，用纯化后的蛋白免疫新西兰大白兔，两个月后收集血清。

1.6 家蚕早期胚胎总蛋白的提取和 Western blot 鉴定

分别取产卵后 0 h、5 h、10 h、11.5 h、13.5 h、15 h、22 h 的蚕卵 50 粒迅速在液氮中冷冻，一式 3 份，置于 -70℃冰箱中保存。取一份材料放进冻存管中，加入 200 μL Tris-HCl，用匀浆机匀浆使其充分破碎，12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清，测定蛋白浓度。分别取各时期的样品 60 μg，进行 SDS-PAGE 分析，用制备的兔抗血清进行 Western blot 分析。

1.7 *Bm-nanos* 在家蚕胚胎不同发育时期中的荧光定量 PCR 分析

PCR 扩增的靶标引物：以 *Bm-nanos* 和 *Bm-actin A3* 基因（参比）序列为靶标，采用 Primer5.0 软件设计特异性引物。引物序列见表 1。

荧光定量 PCR 反应：PCR 反应参照试剂盒 SYBR® ExScript™ RT-PCR Kit（Perfect Real Time）操作手册进行，反应体系均为 20 μL。反应条件 94℃预变性 2 min，扩增 40 个循环（94℃变性 20 s，58℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 20 s）。

数据分析：以家蚕细胞质肌动蛋白 A3（*Bm-actin A3*）基因作为参比基因，以产卵后 0 h 的材料作为基准，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法确定各样本中 *Bm-nanos* 的相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 The special primers in fluorescence quantitative PCR

靶基因 Targets	引物序列 Sequence of primers	扩增片段长度（bp） Length of amplification
Bm-nanos	5′-AGGTCGCTAAAGTTCGCAGTG-3′ 5′-TGTTCGTCCCGCCCATAA-3′	321
Bm-actin A3	5′-GGATGTCCACGTCGCACTTCA-3′ 5′-GCGCGGCTACTCGTTCACTACC-3′	284

2 结果与分析

2.1 家蚕 nanos 的保守性分析

家蚕 nanos 蛋白序列的保守性分析结果见图 1，从图中可以看出家蚕 nanos 蛋白序列有明显的 nanos 保守结构域（图 1：A），形成两个锌指结构的氨基酸残基 CCHC 是完全保守的（图 1：B），家蚕 nanos 保守区域与果蝇和蜜蜂 nanos 保守区域的同源性分别为 70%和 73%；从系统发育树上来看家蚕 nanos 与蜜蜂的 nanos 亲缘关系更近（图 1：C）。

2.2 *Bm-nanos* 的克隆及表达

以 *Bm-nanos* cDNA 为模板进行 PCR 扩增，得到了一条长约 684 bp 的单一条带（图 2）。通过测序后发现，插入片段正确，没有发现突变或移码现象。

将构建的重组表达质粒 pET30a-Bm-nanos 进行 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切分析，电泳结果显示一条约 700 bp 的条带，与预期大小相一致（图 3），说明目的基因成功地亚克隆入表达载体 pET30a 中。

转化 pET30a-Bm-nanos 质粒到大肠杆菌 BL21 后，进行 SDS-PAGE 分析。结果表明，与对照相比，pET30a-Bm-nanos 在约 33 kD 处出现清晰的蛋白条带，表达的蛋白分子量与预期大小相符（图 4：A）。

2.3 Bm-nanos 蛋白在家蚕早期胚胎中的 Western blot 检测

通过 Western blot 检测显示，制备的兔抗血清可以特异性地识别家蚕精巢和卵巢中的 nanos 蛋白（图 4：B），图 5 是家蚕早期胚胎蛋白的 Western blot 检测结果，从图 5 中可以看出，Bm-nanos 蛋白在家蚕

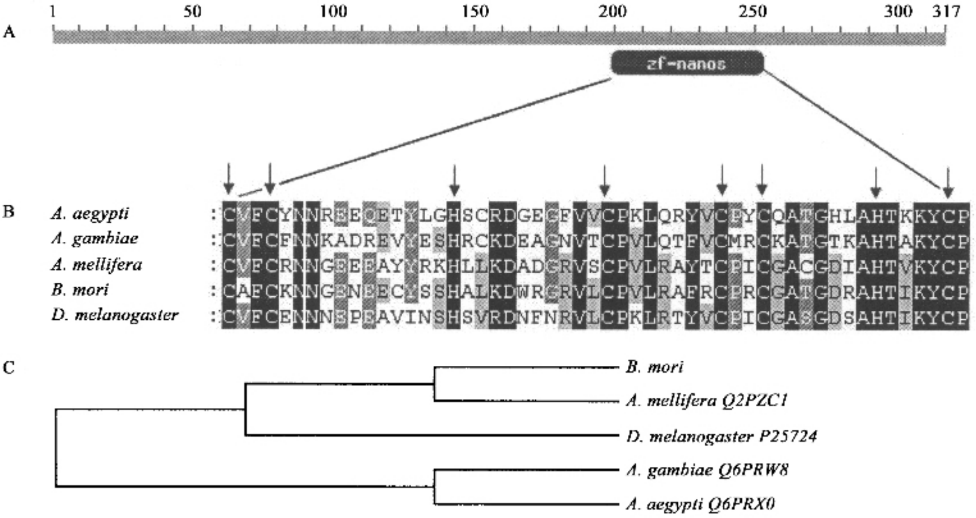
A
1
50
100
150
200
250
300
317
zf-nanos
B
A. aegypti
A. gambiae
A. mellifera
B. mori
D. melanogaster
:CVFCYNNREEQETYLGHSCRDGECFVVCPKLQRYVCPYCQATGHLAHTKKYCP
:CVFCFNNKADREVYESHRCKDEACNVTCPVLQTFVCMRCKATGTKAHTAKYCP
:CVFCRNNGEEEAYYRKHLLKDADGRVSCPVLRAYTCPICGACGDIAHTVKYCP
:CAFCKNNGENEECYSSHALKDWRGRVLCPVLRAFRCPRCGATGDRAHTIKYCP
:CVFCENNNEPEAVINSHSVRDNFNRVLCPKLRTYVCPICGASGDSAHTIKYCP
C
B. mori
A. mellifera Q2PZC1
D. melanogaster P25724
A. gambiae Q6PRW8
A. aegypti Q6PRX0

图 1　Bm-nanos 的保守性分析

Fig. 1　Conservation analysis of Bm-nanos

A：Bm-nanos 的保守结构域 Conserved domain of nanos in *Bombyx mori*；B：nanos 蛋白的多序列比对结果，箭头所指为保守的氨基酸残基，这两个保守的 CCHC 残基可以形成两个锌指结构 Alignment of the most conserved regions of nanos protein sequences from insect. The sequences were aligned using GENEDOC. The arrowheads show the conserved resides among the nanos protein which can form two CCHC zinc finger motifs. C：5 种昆虫 nanos 蛋白的系统发育树 Phylogenetic tree constructed by MEGA3 inferred by the neighbor-joining (NJ) method. The abbreviation of species names and the corresponding accession numbers in Swiss-Prot of their nanos-like protein are indicated.

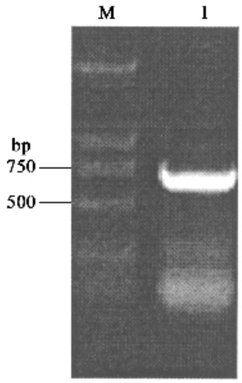

图 2　*Bm-nanos* 基因片段的 PCR 扩增结果

Fig. 2　Amplification of *Bm-nanos* gene fragment

M：DNA 梯度 DNA marker；1：Bm-nanos.

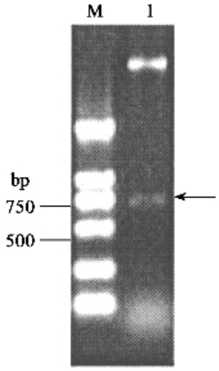

图 3　表达质粒 pET30a-Bm-nanos 的 *Eco*RⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切鉴定

Fig. 3　Restriction analysis for pET30a-Bm-nanos with *Eco*RⅠ and *Xho*Ⅰ

M：DNA 梯度 DNA marker；1：*Eco*RⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切后的表达质粒 pET30a-Bm-nanos digested with *Eco*RⅠ and *Xho*Ⅰ.

胚胎发育的早期都有表达，且表达量基本恒定，箭头所指为目的条带。

2.4　*Bm-nanos* 在家蚕胚胎不同发育时期的荧光定量 PCR 结果

图 6 显示了家蚕不同发育时期胚胎的 *Bm-nanos* 荧光定量 PCR 分析结果，从图 6 中可以看出，*Bm-nanos* 在产卵后的 0 天一直到产卵后第 10 天这段时间都有表达，产卵后 0 天的卵中 *Bm-nanos* 的相对表达量为 1，产卵后第 1 天的卵为 0.64，产卵后第 2 天到第 10 天的卵中 *Bm-nanos* 的相对表达量极低，都在 0.1 以下。整体来看，刚产的卵中 *Bm-nanos* 的表达量最大，随着发育时间的延长，*Bm-nanos* 表达量逐渐下降，产卵后第 2 天急剧下降，此后到第 10 天 *Bm-nanos* 基因的表达量几乎没有变化。

3　讨论

Subramaniam 和 Seydoux (1999) 发现线虫中有 3 个 *nanos* 的同源物，对老鼠的相关研究也发现有 3

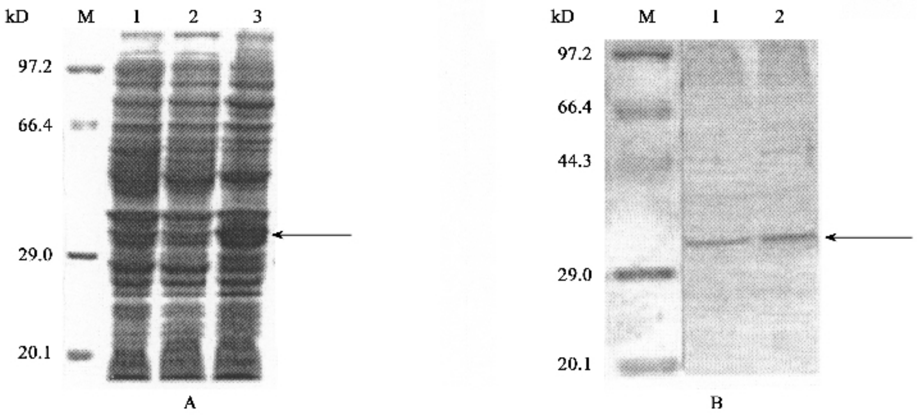

图 4　Bm-nanos 重组蛋白的诱导表达及 Western blot 鉴定

Fig. 4　Expression of recombinant Bm-nanos in *E. coli* and the specificity analysis of antiserum

A：Bm-nanos 的原核表达 Expression of recombinant Bm-nanos in *E. coli*. M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：空 BL21 的表达 BL21 star；2：IPTG 诱导后 pET30a 的表达 BL21 star/pET30a induced by IPTG；3：IPTG 诱导后 pET30a-Bm-nanos 的表达 BL21 star/pET30a-Bm-nanos induced by IPTG. B：抗血清的特异性分析 Specificity analysis of antiserum. M 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1 卵巢总蛋白 Total protein of ovary；2：精巢总蛋白 Total protein of testis.

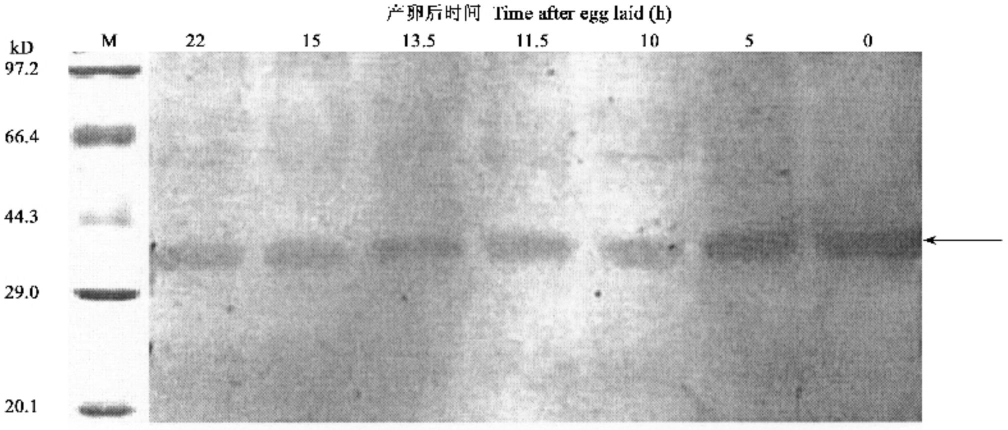

图 5　家蚕早期胚胎各时期的 Bm-nanos 蛋白的 Western blot 检测结果

Fig. 5　Western blot analysis of early embryo protein

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；箭头所指为目的蛋白条带 The arrowhead shows the target protein；一抗为 Bm-nanos 兔抗血 The primary antibody is rabbit antiserum of Bm-nanos described in methods.

个 *nanos* 的同源物（Tsuda *et al*.，2003）；Nakao 等(2006)也向 NCBI 提交了家蚕中 2 种不同的 *nanos* 同源物。从对 Bm-nanos 的保守性分析结果可以看出，本实验所扩增的是家蚕的另一种 *nanos* 的同源物，可能正是这种多个同源物的存在，实现了 *nanos* 的多种功能。

通过对果蝇的相关研究，有学者推断 vasa 蛋白可能和 nanos 蛋白有相互作用，共同调节个体的发育以及生殖细胞的形成（Noce *et al*.，2001）。对蜜蜂的研究发现，*vasa* 和 *nanos* 在胚胎发育中的表达模式极其相似，基本上都是在生殖系细胞中表达（Dearden，2006）。对家蚕早期胚胎有关 Bm-nanos 蛋白的 Western blot 检测表明，Bm-nanos 蛋白在这一阶段有表达，并且表达量基本是恒定的，这一结果与 Nakao 等(2006)对 *vasa* 基因的研究结果极为相似，这种表达模式的相似性也暗示了家蚕中 vasa 和 nanos 也可能有相互作用。

在家蚕的胚胎发育中，从产卵后 0 h 到 22 h 这段时间，经历了卵的受精，合子的分裂，细胞的移动进而形成胚盘，最后形成胚带等一系列的生理过程，可以说这段时间是家蚕胚胎生理活动特别旺盛的一个时期。在果蝇及其他一些物种的研究中发现，*nanos* 能影响生殖细胞的移动以及生殖细胞命运的维持（Kraemer *et al*.，1999；Subramaniam and Seydoux，1999；Tsuda *et al*.，2003）。Nakao 等(2006)对家蚕 *vasa* 基因的研究发现早期生殖细胞在胚带

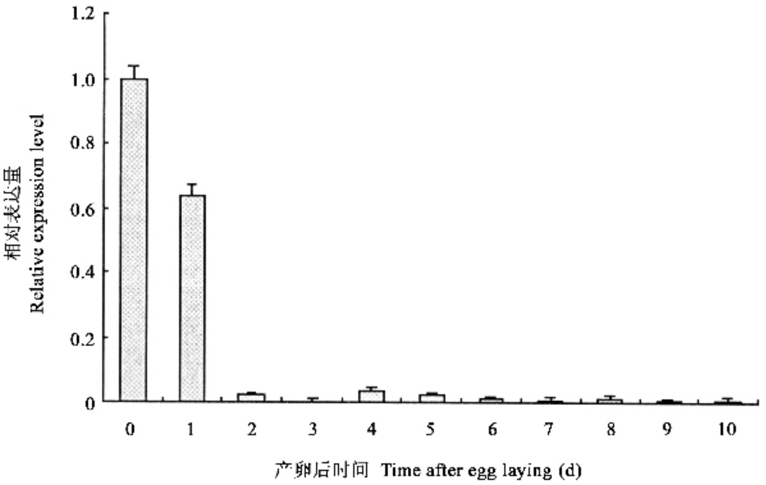

图 6　家蚕胚胎不同发育时期 *nanos* 的荧光定量 PCR 分析结果

Fig. 6　Real-time PCR analysis of *nanos* of *Bombyx mori* embryo at different developmental stages

用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 的方法计算相对表达量，新产卵（产卵后 0 d）的卵作为参照，其相对表达量为 1。The $2^{-\triangle\triangle Ct}$ method was used to calculate the relative expression level. The newly laid egg sample (0 d) was used as the control and its relative expression was defined as one.

形成后会富集在胚带附近。推测在家蚕中，*nanos* 也可能参与了这一早期生殖细胞的富集或移动过程，保持早期生殖细胞的特性，指导其富集在胚胎区域，最终形成性腺。

Dearden（2006）研究发现蜜蜂中 *nanos* 表达在蜜蜂胚胎发育的第 1～2，9，10 阶段，而在第 3～8 个阶段是没有表达的，并且最终集中在蜜蜂的性腺部位。本实验荧光定量 PCR 结果显示，家蚕 *nanos* 是在刚产的卵中表达量最大，到产卵后第 2 天，*nanos* 的表达量急剧下降。单从 mRNA 水平来看，这个结果与蜜蜂中的情况有很大的不同：首先，*nanos* 在家蚕胚胎发育的整个过程中都有表达；其次，就是在家蚕胚胎发育的后期并没有发现 *nanos* 表达上调的现象。通过对蜜蜂 *nanos* 的相关研究，Dearden 等（2006）推测蜜蜂的原始生殖细胞可能形成于胚胎发育后期的某一诱导事件；由于家蚕胚胎发育过程中 *nanos* 的表达形式与蜜蜂有所相似，但又不完全相同，在这一过程中 *nanos* 起作用的方式也可能与蜜蜂相似，但应该有所差异，这正反映了昆虫生殖细胞形成机制的一种多样性。

参 考 文 献（References）

Agee SJ，Lyons DC，Weisblat DA，2006. Maternal expression of a NANOS homolog is required for early development of the leech *Helobdella robusta*. *Dev*. *Biol*.，298（1）：1－11.

Calvo E，Walter M，Adelman ZN，Jimenez A，Onal S，Marinotti O，James AA，2005. *Nanos*（*nos*）genes of the vector mosquitoes，*Anopheles gambiae*，*Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem*. *Mol*. *Biol*.，35（7）：789－798.

D'Agostino I，Merritt C，Chen PL，Seydoux G，Subramaniam K，2006. Translational repression restricts expression of the *C*. *elegans* Nanos homolog NOS-2 to the embryonic germline. *Dev*. *Biol*.，292（1）：244－252.

Dearden PK，2006. Germ cell development in the honeybee（*Apis mellifera*）：*vasa* and *nanos* expression. *BMC Dev*. *Biol*.，6：6.

Deshpande G，Calhoun G，Yanowitz JL，Schedl PD，1999. Novel functions of *nanos* in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell*，99（3）：271－281.

Forbes A，Lehmann R，1998. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development*，125（4）：679－690.

Hulskamp M，Schroder C，Pfeifle C，Jackle H，Tautz D，1989. Posterior segmentation of the *Drosophila* embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene. *Nature*，338（6 217）：629－632.

Irish V，Lehmann R，Akam M，1989. The *Drosophila* posterior-group gene *nanos* functions by repressing hunchback activity. *Nature*，338（6 217）：646－648.

Jaruzelska J，Kotecki M，Kusz K，Spik A，Firpo M，Reijo Pera RA，2003. Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. *Dev*. *Genes Evol*.，213（3）：120－126.

Kobayashi S，Yamada M，Asaoka M，Kitamura T，1996. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature*，380（6 576）：708－711.

Kraemer B，Crittenden S，Gallegos M，Moulder G，Barstead R，Kimble J，Wickens M，1999. NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Curr*. *Biol*.，9（18）：1 009－1 018.

Nakao H，Hatakeyama M，Lee JM，Shimoda M，Kanda T，2006. Expression pattern of *Bombyx vasa*-like（BmVLG）protein and its implications in germ cell development. *Dev*. *Genes Evol*.，216（2）：94－99.

Noce T，Okamoto-Ito S，Tsunekawa N，2001. *Vasa* homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct*. *Funct*.，26(3)：131 – 136.

Olsen LC，Aasland R，Fjose A，1997. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech*. *Dev*.，66(1 – 2)：95 – 105.

Subramaniam K，Seydoux G，1999. *nos*-1 and *nos*-2，two genes related to *Drosophila nanos*，regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development*，126(21)：4 861 – 4 871.

Tsuda M，Sasaoka Y，Kiso M，Abe K，Haraguchi S，Kobayashi S，Saga Y，2003. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*，301(5 637)：1 239 – 1 241.

Wang C，Dickinson LK，Lehmann R，1994. Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Dev*. *Dyn*.，199(2)：103 – 115.

Wang C，Lehmann R，1991. Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell*，66(4)：637 – 647.

（责任编辑：黄玲巧）